

# TREK2-채널 과발현 세포주에서 에피갈로카테킨-3-갈레이트의 세포 증식 억제 효과

김양미\*, 김경아<sup>2</sup>

<sup>1</sup>충북대학교 의과대학 생리학교실, <sup>2</sup>충북대학교 의과대학 의공학교실

## Cell proliferation inhibition effects of epigallocatechin-3-gallate in TREK2-channel overexpressing cell line

Yangmi Kim<sup>1</sup>\*, Kyung-Ah Kim<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Physiology, College of Medicine, Chungbuk National University

<sup>2</sup>Dept. of Biomedical Engineering, College of Medicine, Chungbuk National University

**요약** Two-pore 도메인 포타슘 채널(two-pore domain K<sup>+</sup> channel, K2P channel)은 세포내 pH, 생리 활성 지질, 신경 전달 물질과 같은 생리학 적 자극의 표적이며 안정막전압(resting membrane potential)을 설정하는 것으로 알려져 있다. 일부 유형의 K2P 채널들은 세포 사멸 및 종양 형성 등에서 중요한 역할을 한다. K2P 채널 중 TREK2 채널의 길항제는 보고되지 않았다. 본 연구의 목적은 TREK2 채널을 과발현시킨 HEK293 세포(HEKT2)에서 플라보노이드에 의해 TREK2 채널이 억제되는지 그리고 HEKT2 세포의 증식이 플라보노이드에 의해 영향을 받는지 알아보고자 하였다. 전기생리학 적 전류는 단일 채널 patch clamp 방법을 사용하여 기록하였고 세포 증식은 XTT 에세이방법을 이용하여 측정하였다. HEKT2 세포에서 전기생리학 적 TREK2 채널 활성도는 에피갈로카테킨-3-갈레이트(EGCG) 및 케르세틴과 같은 플라보노이드에 의해 각각 91.5±13.1%(n=5), 82.2±13.7%(n=5)까지 억제되었다. 반면, EGCG 유사체인 에피카테킨(EC)는 TREK2 단일 채널 활성도에 현저한 억제 효과는 없었다. 또한 HEKT2 세포에서 세포 증식이 EGCG에 의해 69.4±14.0%(n=4)까지 감소되었음을 확인하였다. 결과로부터 EGCG와 케르세틴이 TREK2 채널 억제제임을 처음으로 확인하였고, EGCG만 HEKT2 세포의 증식을 감소시킨다는 결론을 얻었다. 본 연구의 결과는 EGCG 및 케르세틴이 TREK2 채널을 억제함으로써 막전압의 변화 유도과 세포 증식에 필요한 세포내 신호 변화의 시작을 트리거하는데 일차적으로 작동할 수 있음을 시사한다.

**Abstract** Two-pore domain potassium (K2P) channels are the targets of physiological stimuli, such as intracellular pH, bioactive lipids, and neurotransmitters, and they set the resting membrane potential. Some types of K2P channels play a critical role in both apoptosis and tumorigenesis. Among the K2P channels, no antagonists of the TREK2 channel have been reported. The aim of the present study was to determine if the TREK2 channel is blocked and whether cell proliferation is influenced by flavonoids in the TREK2 overexpressing HEK293 cells (HEKT2). The electrophysiological current was recorded using single channel patch clamp techniques and cell proliferation was measured using a XTT assay. The electrophysiological results showed that the TREK2 channel activity was reduced to 91.5±13.1% (n=5) and 82.2±13.7% (n=5) by flavonoids, such as epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and quercetin in HEKT2 cells, respectively. In contrast, the EGCG analogue, epicatechin (EC), had no significant inhibitory effects on the TREK2 single channel activity. In addition, cell proliferation was reduced to 69.4±14.0% (n=4) by EGCG in the HEKT2 cells. From these results, EGCG and quercetin represent the first known TREK2 channel inhibitors and only EGCG reduced HEKT2 cell proliferation. This suggests that the flavonoids may work primarily by inhibiting the TREK2 channel, leading to a change in the resting membrane potential, and triggering the initiation of a change in intracellular signaling for cell proliferation. TREK2 channel may, at least in part, contribute to cell proliferation.

**Keywords** : Epigallocatechin-3-gallate(EGCG), Flavonoid, Quercetin, TREK2, Two-pore domain potassium(K2P) channels

본 논문은 2013년도 충북대학교 학술연구지원사업에 의하여 연구되었으며, 2015년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(NRF-2015R1A2A2A040042 51).

\*Corresponding Author : Yangmi Kim (Chungbuk National Univ.)

Tel: +82-43-261-2855 email: yangmik@chungbuk.ac.kr

Received February 12, 2016

Revised (1st February 22, 2016, 2nd February 23, 2016, 3rd February 28, 2016, 4th

Accepted March 3, 2016

February 29, 2016, 5th March 2, 2016)

Published March 31, 2016

## 1. 서론

포타슘 채널은 세포막전압을 안정화시키는 역할을 하는 채널로서 78개 유전자형의 이온 채널 패밀리를 가지고 있다[1]. 그 채널 중 K2P 채널(two-pore domain K<sup>+</sup> channel)은 15개(기능하지 않은 것을 포함하면 18개)로 알려져 있으며 막전압 의존성 포타슘 채널(voltage-dependent K<sup>+</sup> channel, K<sub>V</sub>)이나 칼슘에 의해 활성화 포타슘 채널(Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel, K<sub>Ca</sub>)들과는 달리 안정막전압(resting membrane potential) 상태에서 항상 열려 있어 leak 채널 또는 background 채널이라고 불리기도 한다[1]. 그 종류로는 제일 먼저 클로닝된 Two P-domain in a Weakly Inward rectifying K<sup>+</sup> channel인 TWIK, 세포밖 산성 pH에 의해 억제되는 TASK(TWIK-related Acid-Sensitive K<sup>+</sup> channel), 세포밖 알칼리 pH에 의해 활성화되는 TALK(TWIK-related ALKaline-sensitive K<sup>+</sup> channel), 불포화 지방산 및 세포막 신전(stretch)에 의해 활성화되는 TREK(TWIK -RElated K<sup>+</sup> channel), 휘발성 마취제인 할로탄에 의해 억제되는 THIK(Tandem pore domain Halotane-Inhibited K<sup>+</sup> channel), 척수에서 많이 발견되는 TRESK(TWIK-RELATED Spinal cord K<sup>+</sup> channel)등이 있다[1]. 이 채널은 신경, 심장, 근육과 내분비 기관에서 막전압을 조절하고, 신경 전달 물질에 의해 신경 활성도를 조절하는 것으로 알려져 있다[1].

플라보노이드 중 폴리페놀 화합물인 케르세틴(querctetin, 3, 3', 4', 5, 7-pentahydroxyflavone)과 epigallocatechin-3 gallate(EGCG)는 항암, 항염증, 항산화제로 알려져 있다[2]. 그 중 EGCG는 녹차에서 유래된 것으로 많은 사람들에게 음용되는 차 성분이다. 이러한 폴리페놀이 이온 채널에 대한 효과가 있다면 약으로서의 효용가치는 높아 많은 연구가 이루어지고 있다[3]. K2P 채널에 대한 플라보노이드의 효과는 보고된 바 있고 최근 우리도 TREK2(Genbank accession No: NM\_023096)와 전기생리학적으로 유사한 TREK1 채널이  $\mu$ M 수준의 플라보노이드에 의해 억제됨을 확인하였다[4, 5]. 하지만 TREK2에 대한 플라보노이드에 대한 효과는 보고된 바 없다. TREK1과 TREK2가 아미노산 서열에서 65% 유사성을 가지고 있지만 TREK2는 C-terminus가 TREK1보다 길고 TREK2는 C-terminus 부위에 pH 반응기와 세포막 신전에 대한 반응기가 있는 것으로 알려져 있다

[6]. 그러므로 TREK1과 반응이 다르게 나타날 수 있다 [7]. 또한 TREK1과 TREK2는 전기생리학적으로 단일 채널 전도도나 전류전압곡선의 차이가 나므로 TREK2에 대한 연구는 필수 불가결하다. TREK2 또한 세포가 허혈에 빠졌을 때 활성화되는 채널이어서 이 채널을 조절하는 천연물이 규명되어진다면 신약 개발에 중요한 단서가 될 것이다.

몇몇 칼슘 채널을 포함한 이온 채널 조절제는 항고혈압 약으로 사용되고 뇌의 혈관 경련을 방지하고 심장박동수를 변화시켜 협심증시 흉통을 감소시켜 주는 역할을 한다[8]. 이처럼 이온 채널 단백질을 표적으로 하는 약들이 개발되면서 이온 채널 단백질 표적 약물 연구는 매우 중요하고 세계적으로도 확장 추세에 있다[9]. 단일 이온 채널 단백질을 표적으로 하는 약물을 발견하거나 시험하기 위해서는 이온 채널이 지속적이고 안정적으로 과발현된 세포주의 확립이 필요하고 단일 채널에 대한 약물 효과의 검증이 필요하다. 즉, 단일 이온 채널을 과발현한 세포주의 개발로 합성 약물 또는 천연 추출물의 효과를 쉽게 연구할 수 있게 되었다[4, 10]. 그러므로 본 연구에서는 TREK2 채널이 지속적이고 안정적으로 과발현된 HEK 세포(HEKT2)에서 플라보노이드의 효과를 전기생리학적 관점에서 조사하고 TREK2를 조절하는 플라보노이드가 세포 증식에 어떤 영향을 주는지 조사하였다. 또한 TREK2가 과발현되지 않는 HEK293 세포(HEK)에서 플라보노이드에 대한 세포 증식의 영향도 비교 관찰하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 세포 배양

HEKT2는 C 대학교에서 분양받아 사용하였다. 세포는 10% fetal bovine serum(FBS)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 penicillin 200 units/ml와 streptomycin 200  $\mu$ g/ml를 넣어, 5% CO<sub>2</sub>가 포함된 37°C의 가습 인큐베이터에 배양하였다.

### 2.2 전기생리학적 기록

전기생리학적 기록은 선행연구에서 기록된 방법으로 기록하였고[4, 11], patch clamp 증폭기 (Axopatch 200B, Axon Instruments, Inc., Foster city, CA)를 사용

하여 단일 채널 기록을 수행하였다[12]. 모든 기록은 실온(22-24°C)에서 수행하였다.

### 2.3 실험용액

세포막 용액을 구성하는 유리전극(pipette) 용액과 세포내 용액을 구성하는 bath 용액은 150 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 5 mM EGTA로 동일하게 구성하고, HCl을 이용하여 pH 7.2로 적정하였다. 플라보노이드는 물 또는 DMSO를 이용하여 1000배까지 희석하여 사용하였다.

### 2.4 세포 증식 분석

HEKT2 및 HEK 세포의 증식과정에서 플라보노이드의 효과를 평가하기 위하여, 세포 증식 분석 XTT kit를 사용하였다(Biological Industries Israel Beit-Haemek Ltd. Kibbutz Beit-Haemek, Israel). 방법을 요약하면 아래와 같다. 1x10<sup>4</sup>개의 세포를 96 well에 100 µl/well 씩 넣어 배양하고 플라보노이드 및 포타슘 채널 차단제 (TEA)를 넣어 3일간 배양하였다. 3일 후 XTT 라벨링액 50 µl를 추가하여 4시간 동안 배양하였다. 분광광도계 (SpectraMax M5e, Sunnyvale, CA)로 450~550 nm에서 흡광도를 측정하였고, 비특이적인 반응을 배제하기 위해 630~690 nm의 파장을 측정하여 분석에 사용하였다.

### 2.5 전기생리학적 데이터 분석

전기생리학적 데이터는 pCLAMP 프로그램(version 9.02, Axon instrument, Union City, CA)을 이용하여 이온 채널 활성도(NP<sub>o</sub>, N은 이온통로의 수, P<sub>o</sub>는 활성을 가진 채널의 열릴 확률)로 분석하였다. 단일 채널 전류 trace는 2 kHz에서 필터하여 사용하였다.

TREK2 전류에 대한 플라보노이드의 농도-반응 그래프를 그리기 위해 Origin software (OriginLab, Corp, Northampton, MA, USA)에서 Hill 공식( $y=1/(1+(IC_{50}/[F])^n)$ )을 사용하였다. y는 채널 활성도를 나타낸다. IC<sub>50</sub>은 플라보노이드에 의해 TREK2 채널이 50% 억제되는 값이며 n은 Hill 상관계수, F는 플라보노이드의 농도이다. 상대적 채널 활성도(relative channel activity)는  $N_{Test}P_{oTest}/N_{Control}P_{oControl}$ 로, 상대적 전류(relative current)는  $I_{Test}/I_{Control}$ 로 계산하였다. 모든 수치는 평균 ±S.E.로 나타내었다. 플라보노이드 처리전의 평균값과 플라보노이드 처리 후 평균값의 차이는 unpaired(independent)

student's test를 사용하였고 모든 통계량의 유의수준은 P<0.05로 하였다.

## 3. 결과

### 3.1 TREK2 대한 EGCG 및 케르세틴 효과

단일 채널 기록법을 사용하여 TREK2에 대한 EGCG 및 케르세틴과의 효과를 조사하였다. Patch clamp 방법 중에서 세포안이 세포밖으로 드러나는 방법인 inside-out patch 모드에서 TREK2 채널에 대한 EGCG 효과를 관찰했다(Table 1과 Fig. 1). 유지 전압(holding potential)은 -60 mV로 고정한 채 기록된 TREK2 채널 상대적 활성도는 50 µM의 EGCG에 의해 91.5±13.1%(n=5)까지 감소하였다(Table 1, Fig. 1a, Fig. 1b). Table 1은 플라보노이드에 의해 TREK2 채널이 활성도가 얼마나 억제되는지 보여주고 있다. EGCG 처리전 TREK2 채널의 상대적 활성도의 감소 효과를 0%로 볼 때 EGCG를 처리하였을 경우 약 92%까지 억제됨을 보여주고 있다 (Table 1).

Table 1. The relative TREK2 channel activity by flavonoids

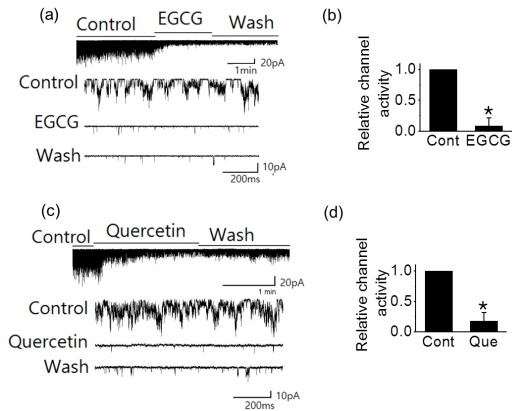
Flavonoids (50µM)	전압 (mV)	상대적 채널활성도 감소효과(%) (평균 ± S.E.)
EGCG	-60	91.53±13.14*
Quercetin	-60	82.19±13.69*
Apigenin	-60	0.10±1.20
EC	-60	2.10±1.20

\*\* 상대적 채널 활성도 :  $N_{Test}P_{oTest}/N_{Control}P_{oControl}$

\*: p < 0.05에서 유의성 있음, n=5

EGCG에 의해 억제된 TREK2 채널은 EGCG가 없는 용액으로 관류하여도 회복되지 않았다(Fig. 1a).

다른 종류의 플라보노이드인 케르세틴의 TREK2 채널 활성도에 대한 효과도 조사하였다 (Table 1, Fig. 1c, Fig. 1d). 케르세틴 처리전의 TREK2 채널 활성도의 감소 효과를 0%로 볼 때 세포내에 50 µM의 케르세틴 적용시 TREK2 채널 상대적 활성도를 82.2±13.7%까지 감소시켰다(Table 1과 Fig. 1c와 1d, n=5). 케르세틴에 의해 억제된 전류는 케르세틴을 없앤 용액에서 거의 회복되지 않았다(Fig.1c).

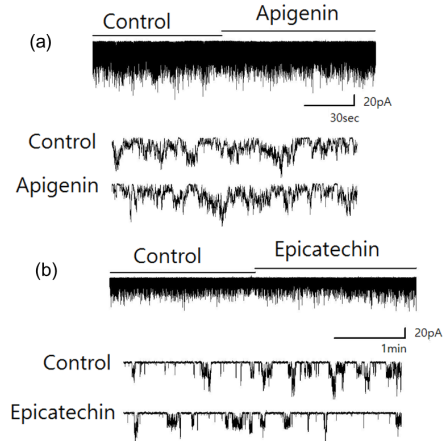


**Fig. 1.** The effects of EGCG and quercetin on TREK2 channel activity in HEK2 cells. (a and c) EGCG (50  $\mu$ M) and quercetin (50  $\mu$ M) inhibited TREK2 channel activity. A representative channel trace for EGCG and quercetin inhibited TREK2 current was voltage-clamped under inside out patch configuration at -60 mV. Expanded single channel current trace were showed before (control), after the response to EGCG (50  $\mu$ M) and quercetin (50  $\mu$ M) reached a stable level and after washing with EGCG-free and quercetin-free solution. (b and d) Relative channel activity showed in (b) and (d) before and after treatment of EGCG or quercetin. Pipette and bath solutions for electrophysiological recording contained 150 mM KCl, 1 mM  $MgCl_2$ , 10 mM HEPES and 5 mM EGTA. Asterisks indicate values which are different from the respective control (t-test,  $P < 0.05$ ).

### 3.2 TREK2에 대한 아피제닌(apigenin) 및 에피 카테킨(epicatechin)의 전기생리학적 효과

과슬리에서 유래된 아피제닌(apigenin, 5, 7- Dihydroxy -2-(4-hydroxyphenyl)-4h-1-benzopyran-4-one)과 EGCG의 유사체인 에피카테킨 (epicatechin, EC)의 TREK2 채널에 대한 효과를 테스트하였다. 녹차에서 유래된 카테킨 종류는 EGCG, (-)-epigallocatechin(EGC), (-)-epicatechin gallate(EGC) 및 (-)-epicatechin(EC)가 있다[14]. 이들 중 본 연구에서는 EC와 EGCG에 대한 TREK2 채널에 대한 효과를 조사하였다. Inside-out patch 모드에서 유지전압 -60 mV에서 실험을 수행하였다. EGCG 또는 케르세틴과는 달리 50  $\mu$ M 아피제닌 및 EC는 TREK2 채널 활성화에 영향을 주지 않았다(Table 1, Fig. 2a, 2b). 아피제닌이나 EC는 table 1에서 보듯이 TREK2 채널 활

성의 감소 효과는 거의 0%에 가깝다. 즉 이러한 결과는 아피제닌이나 EC는 TREK2 채널 차단에 거의 영향을 주지 못한다는 것을 제시한다.



**Fig. 2.** The effects of epicatechin (EC) and apigenin on HEK2 cells. (a and b) EC (50  $\mu$ M) and apigenin (50  $\mu$ M) did not affect TREK2 channel activity. A representative channel trace for EC and apigenin inhibited current was voltage-clamped under inside out patch configuration at -60 mV. Expanded single channel current trace were showed before (control) and after the response to EC (50  $\mu$ M) and apigenin. Pipette and bath solutions contained 150 mM KCl, 1 mM  $MgCl_2$ , 10 mM HEPES and 5 mM EGTA

### 3.3 TREK2에 대한 EGCG과 케르세틴 농도 의존성

TREK2 채널의 전류 전압(current-voltage relationship, I-V) 곡선은 TREK1이 외향정류(outward rectification) 전류를 보이는 것과 달리 내향정류(inward rectifying) 전류를 보인다[13]. EGCG와 케르세틴의 TREK2에 대한 농도 반응을 조사하기 위해 inside-out macro patch 모드에서 유지 전압을 0 mV 고정하고 -100 mV에서 100 mV 램프 펄스를 200 ms 동안 가하여 전류를 기록하였다. TREK2 채널 활성화에 대한 EGCG와 케르세틴 농도를 점진적으로 증가시키면서 전류를 기록하고 분석하였다(Fig.3). EGCG(0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100  $\mu$ M)와 케르세틴(0, 0.5, 5, 30, 50, 100  $\mu$ M)의 농도가 증가함에 따라 TREK2 전류의 크기를 감소시켰다. Table 2는 EGCG를 농도에 따라 처리하였을 경우 TREK2의 전류

의 감소효과를 나타낸 것이다. EGCG가 없는 용액을 흘렸을 경우 나타나는 전류의 크기를 1로 볼 때 농도가 0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100  $\mu\text{M}$ 까지 증가될수록 전류의 크기가 점점 감소됨을 보여주고 있다. 이러한 효과를 플롯팅하여 Hill 공식을 이용하여 핏팅하였을 경우 EGCG가 TREK2 전류를 50% 억제하는 농도( $\text{IC}_{50}$ )는  $18.9 \pm 1.42 \mu\text{M}$  ( $n=5$ )로 나타났고 Hill 기울기 계수가 2.08이었다(Fig. 3a). Table 2에서 보듯이 10  $\mu\text{M}$ 에서도 TREK2 전류가 control 전류 1과 비교하였을 경우 0.78로 거의 억제되지 않았고 100  $\mu\text{M}$ 이 되면 전류의 크기가 현저히 줄어들고 있어 이것은 적어도 수십  $\mu\text{M}$ 이 되어야 TREK2 채널이 차단될 수 있음을 시사한다.

**Table 2.** The dose dependency of EGCG on relative TREK2 current

EGCG ( $\mu\text{M}$ )	전압 (mV)	EGCG 상대적 전류 (평균 $\pm$ S.E.)
0	-60	1 $\pm$ 0
0.1	-60	0.94 $\pm$ 0.10
1	-60	0.94 $\pm$ 0.08
10	-60	0.78 $\pm$ 0.15
100	-60	0.02 $\pm$ 0.10

\*\* 상대적 채널 전류 :  $I_{\text{Test}}/I_{\text{Control}}$  ( $n=5$ )

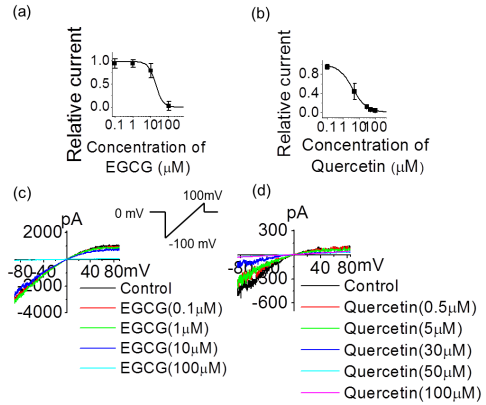
Table 3 또한 케르세틴을 농도에 따라 처리 하였을 경우 TREK2 전류 감소효과를 나타낸 것이다. 케르세틴이 없는 용액에서 전류의 크기를 1로 볼 때 케르세틴 농도가 0, 0.5, 5, 30, 50, 100  $\mu\text{M}$ 까지 증가될수록 점점 전류의 크기가 점점 감소됨을 보여주고 있다. 이러한 효과를 플롯팅하여 Hill 공식을 이용하여 핏팅하였을 경우 케르세틴의  $\text{IC}_{50}$ 은  $3.9 \pm 1.8 \mu\text{M}$  ( $n=5$ ) 이었고 Hill 기울기 계수가 0.99 이었다(Fig. 3b). 케르세틴의 경우 EGCG와는 달리 5  $\mu\text{M}$ 에서 이미 전류의 크기가 0.44로 현저히 줄어들 있음을 보여주고 있다(Table 3).

**Table 3.** The dose dependency of quercetin on relative TREK2 current

Quercetin ( $\mu\text{M}$ )	전압 (mV)	EGCG 상대적 전류 (평균 $\pm$ S.E.)
0	-60	1 $\pm$ 0
0.1	-60	0.95 $\pm$ 0.05
5	-60	0.44 $\pm$ 0.16
30	-60	0.13 $\pm$ 0.01
50	-60	0.07 $\pm$ 0.18
100	-60	0.043 $\pm$ 0.01

\*\* 상대적 채널 전류 :  $I_{\text{Test}}/I_{\text{Control}}$ ,  $n=5$

Fig. 3c 및 3d는 대표적인 농도 의존 I-V 곡선을 나타낸 것으로 외향전류보다는 내향전류가 더 커지는 전형적인 TREK2 전류 모양을 보이고 있다.

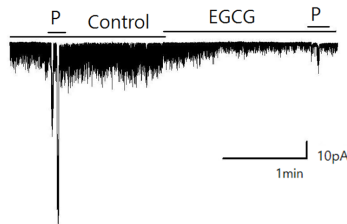


**Fig. 3.** EGCG and quercetin concentration-response curve for TREK2 channel in HEKT2 cells. HEKT2 cells were voltage-clamped under inside-out macropatch configuration at 0 mV. The bath solution contained 0  $\mu\text{M}$  ~100  $\mu\text{M}$  EGCG and quercetin. (a and b) Dose-dependent effects of EGCG and quercetin on TREK2 at -60 mV were plotted. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. ( $n=5$  cells per concentration). (c and d) Current-voltage relationship with dose dependency. EGCG and quercetin inhibited TREK2 current continually recorded by 150-ms ramp from -100 to 100 mV (as shown in the inset) at holding potential of 0 mV. The inward rectifying current was inhibited by EGCG and quercetin dose dependently. Percent inhibition by EGCG and quercetin of TREK2 channel current was calculated from -60 mV after application of EGCG and quercetin.

### 3.4 EGCG의 존재시 TREK2에 대한 세포막 신전에 대한 민감도

TREK2는 TREK1처럼 세포막의 신전에 의해 활성화되는 것으로 알려져 있다[15]. EGCG와 케르세틴이 TREK2 전류를 억제하였으므로 억제된 전류가 세포막 신전에도 영향을 주는지 확인하기 위해 25  $\mu\text{M}$  EGCG를 세포내에 적용하여 TREK2에 대한 세포막 신전에 대한 반응을 조사하였다(Fig. 4). Fig. 4는 EGCG 유무와 음압 (negative pressure, P) 유무에 따라 TREK2의 세포막 신전에 대한 기계적 민감도(mechanosensitivity)를 보여주

고 있다. EGCG가 없을 경우에는 유지전압 -60 mV에서 -10 mmHg~-30 mmHg의 기계적 음압에 의해 TREK2 채널 활성이 증가되고 음압이 사라졌을 경우는 처음 수준으로 회복되었다. EGCG 처리 후에도 채널 활성은 남아 있었으나 음압에 반응하는 민감도는 매우 떨어져 있었다(Fig. 4). 이러한 결과는 플라보노이드가 TREK2 채널의 세포막 신전에 대한 민감도를 감소시킬 수 있음을 제시한다.



**Fig. 4.** Mechanosensitivity of TREK2 channels by EGCG. The negative pressure (denoted as P) was applied from -10 mmHg to -30 mmHg. The addition of EGCG (25  $\mu$ M) alone decreased the sensitivity of membrane stretch. Pipette and bath solutions contained 150 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES and 5 mM EGTA

### 3.5 HEKT2 와 HEK 세포에서 세포 증식과 플라보노이드 효과와의 연관성

플라보노이드는 세포 증식 및 세포 사멸에 영향을 주는 것으로 알려져 있다[16]. EGCG가 TREK2 채널을 억제하므로 HEKT2 세포에서 EGCG 처리 전후 세포의 증식에 어떤 영향을 주는지 조사하였다. HEK 세포와 HEKT2 세포에 플라보노이드 처리시 세포 증식 효과를 XTT 분석법을 이용하여 분석하였다(Table 4와 Fig. 5, n=4). Table 4는 TREK2가 발현되지 않은 HEK 세포와 TREK2가 과발현된 HEKT2 세포에서 플라보노이드의 효과를 비교하였다. HEK 세포와 HEKT2 세포에서 플라보노이드를 처리하지 않았을 경우(control) 세포 증식 억제 효과를 0%로 볼 때 HEK 세포에서 EGCG 및 케르세틴의 효과는 미미 하였다(EGCG:24% 감소, 케르세틴: 11% 감소). 하지만 TREK2가 발현된 HEKT2에서는 EGCG 처리시 플라보노이드가 처리되지 않은 control 세포와 비교할 때 거의 69.4±14.0%(n=4)까지 세포 증식이 감소하였음을 볼 수 있다(Table 4와 Fig. 5). 케르세

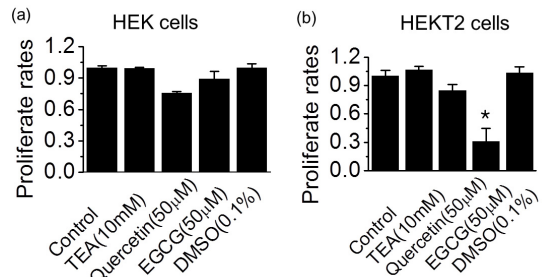
틴 처리시에는 HEKT2 세포 증식 감소효과가 HEK 세포에서보다 더 적게 나타났다(Table 4, HEK vs HEKT2, 24% vs 15%). 그리고 포타슘 채널 억제제인 TEA 처리시에 HEKT2 세포에서 증식이 약간 증가(증식 억제효과가 -로 표시됨) 되어있음을 알 수 있다(Table 4).

**Table 4.** The comparison of relative cell proliferation rate between HEK and HEKT2 cells after treatment with flavonoids

Agents	HEK cells (inhibitory effect of proliferation, %)	HEKT2 cells (inhibitory effect of proliferation, %)
Control	0.00±1.70	0.00±6.03
TEA (10 mM)	0.56±0.86	(-)6.38±0.39
Quercetin (50 $\mu$ M)	24.32±1.29	15.3±6.28
EGCG (50 $\mu$ M)	10.68±6.94	69.36±14.00*
DMSO (0.1%)	0.35±3.82	(-)3.26±6.28

\*: p < 0.05에서 유의성 있음, n=4, (-): 증식을 의미

Table 4의 결과를 Fig. 5에 나타내었다(Fig. 5). Fig. 5에서도 HEKT2 세포에서 EGCG에 의해 세포의 증식이 현저히 억제됨을 보여주고 있다.



**Fig. 5.** The relevance of cell proliferation on HEK and HEKT2 by flavonoids (a) Percent proliferation of non-transfected HEK293 (HEK) cell in the presence of flavonoid and TEA. DMSO was used as a control. EGCG induced cytotoxicity in TREK2 transfected HEK 293 (HEKT2) cells. Cells were treated for 3 days with flavonoid such as EGCG (50  $\mu$ M), quercetin (50  $\mu$ M) and TEA. Cell survival was determined by the XTT assay. Error bars represent standard error from the mean (SEM) for 4 separate experiments. Asterisks indicate values which are different from the respective control (t-test, P<0.05).

#### 4. 고찰

본 연구에서는 TREK2 과발현 HEK293 (HEKT2) 세포에서 TREK2 채널이 EGCG와 케르세틴에 의해 차단됨을 확인하였고, 이 두 플라보노이드 중 EGCG만이 HEKT2 세포 증식 억제를 유도하였음을 확인하였다.

HEKT2 세포에서는 EGCG에 의한 증식 억제 효과가 있고 TREK2가 발현되지 않은 HEK 세포에서는 EGCG에 의한 증식 억제 효과가 거의 없는 것으로 볼 때 EGCG에 의한 HEKT2 증식 억제 효과는 TREK2 채널의 차단 효과 때문인 것으로 판단된다. 그러나 케르세틴의 경우는 TREK2 채널을 EGCG 보다 낮은 농도에서 차단함에도 불구하고(Fig. 3과 Table 3) HEKT2 증식 억제 효과는 미미하였다(Fig. 5와 Table 4). 이러한 현상은 케르세틴이 다른 유형의 포타슘 채널 활성을 유도하여 TREK2 채널의 억제 효과를 상쇄하기 때문일 것으로 추측된다. 몇몇 연구에서 케르세틴이 채널 활성 효과가 있다는 보고가 이러한 추측을 뒷받침한다. 즉 CFTR Cl<sup>-</sup> 채널[17], Ca<sup>2+</sup> 채널[18], K<sub>Ca</sub>[19], K<sub>V1.5</sub>[20] 채널에서 케르세틴에 의한 채널 활성이 보고되어 있고 본 연구팀에서도 방광암 세포에서 케르세틴에 의한 K<sub>Ca</sub> 활성 및 세포 성장과의 연관성을 보고한 바 있다[21]. HEKT2 세포에서는 케르세틴이 TREK2 채널을 열리게 하는 것이 아니라 닫히게 하는 효과가 있다. 그렇기 때문에 HEKT2 세포에서 케르세틴에 의한 세포 증식 억제 효과의 감소는 케르세틴-유발 세포내 칼슘 증가 또는 케르세틴-유발 K<sub>Ca</sub>의 활성(quercetin-induced K<sub>Ca</sub> activation)이 케르세틴에 의한 TREK2 전류의 억제효과를 상쇄하기 때문인 것으로 추측된다. 이러한 추측은 방광암에서 케르세틴-유발 K<sub>Ca</sub> 채널 활성이 세포의 증식을 억제한다는 보고로 설명될 수 있다[21].

케르세틴은 여러 종류의 이온 채널을 활성화시킨다고 알려져 있지만[17-20], TREK2 채널은 차단하였다(IC<sub>50</sub>; 4 μM, Fig. 3). TREK2 채널을 차단하는 효과를 나타내는 농도는 TREK1 채널을 차단하는 IC<sub>50</sub> 1.1 μM[4]에 비하면 4배 정도 높은 농도 수준이지만 IC<sub>50</sub>가 65 μM인 5-HT-유발 내향전류(I<sub>5HT</sub>)[22]보다는 농도가 16배나 낮은 농도이고, IC<sub>50</sub>가 15 μM인 acetylcholine 감수체 매개 이온전류(acetylcholine receptor mediated ion current, I<sub>Ach</sub>)[23]에 비하면 4배, IC<sub>50</sub>가 11 μM 신경세포의 글라이신-유발 전류(glycine-induced current, I<sub>Gly</sub>)[24]보다는

3배 정도 낮은 농도이다. 그러므로 TREK2에 대한 억제제로 케르세틴의 역할 효용성이 높을 것으로 생각된다. 하지만 케르세틴이 세포내 칼슘을 증가시키는 작용이 있어 칼슘에 의존적인 이온 채널 활성도 고려하여 사용하여 할 것으로 생각된다.

EGCG가 TREK2 채널의 IC<sub>50</sub>는 19 μM 정도로 K<sub>V11.1</sub> 채널인 hERG 채널 (human Ether-à-go-go-Related Gene)을 억제하는 EGCG의 IC<sub>50</sub>는 6 μM에 비하면 높지만[3] 뇌에서 클로닝된 K<sub>V1.5</sub>의 IC<sub>50</sub> 101.2 μM[25]에 비하면 5분의 1 정도의 수준이고, 전기생리학적으로 성질이 유사한 TREK1에 대한 EGCG의 IC<sub>50</sub>는 14 μM과는 유사한 농도였다[4]. 이러한 결과는 TREK2 채널에 대한 EGCG의 효과가 μM 수준에서 작용하므로 TREK 채널 차단제로서는 유효할 수 있고 채널 종류에 따라 채널에 작용하는 농도는 차이가 있음을 시사한다. 또한 EGCG와 케르세틴의 경우 TREK2 채널에 대해 비가역적으로 작용하기 때문에(Table 1과 Fig. 1) TREK2 채널에 대한 플라보노이드 적용시 주의가 요구된다.

포타슘 채널은 안정막전압을 유지하여 세포 항상성 유지에 기여한다[26]. 포타슘 채널 차단은 세포막의 탈분극을 유도하고 세포내 용질을 증가시켜 세포안으로의 물 유입을 증가시켜 세포의 증식을 감소시키는 결과를 유도할 수 있다[27-29]. 즉, 포타슘 채널 차단에 의한 막전압의 변화는 세포의 증식 단계 조절(성장 촉진 인자의 분비, 활동 전압 제어, 세포안으로의 칼슘 유입, 세포 용량을 조절)함으로써 세포 증식과 세포 사멸 기전에 기여하기 때문이다[30]. 그러므로 플라보노이드에 의한 채널의 차단은 세포 생존 또는 증식 기전과 관련이 있음이 자명하고[31, 32], HEKT2에서의 EGCG에 의한 세포 증식 능력의 감소는 플라보노이드에 의한 TREK2 채널 억제에 의해 생길 수 있음을 제시하고 있다.

본 연구에서 이온 채널 약물 스크리닝의 일환으로 TREK2 과발현 세포주를 이용하였다. TREK2 과발현 세포주는 암 치료제, 신경보호제 및 심장보호 약물을 발견할 수 있는 실마리를 제공할 수 있는 기초적인 도구이며 기술의 산물이다. 그러므로 앞으로 단일 K<sub>2P</sub> 채널을 포함한 더 많은 종류의 이온채널 과발현 세포주의 형성이 필요할 것으로 생각된다.

## 5. 결론

TREK2 채널은 EGCG와 케르세틴에 의해 차단되고 TREK2 과발현 HEK293 세포에서 TREK2 채널을 억제하는 EGCG만이 세포의 증식을 억제할 수 있었다. 이러한 세포 증식 억제는 EGCG의 TREK2 채널 차단에 의한 것임을 확인하였다.

## References

- [1] S. Feliciangeli, F. C. Chatelain, D. Bichet, F. Lesage, "The family of K2P channels: salient structural and functional properties", *J Physiol*, Vol.593, No.12, pp. 2587-603, Jun, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2014.287268>
- [2] G. Di Carlo, N. Mascolo, A. A. Izzo, F. Capasso, "Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs", *Life Sci*, Vol.65, No.4, pp.337-53, Jun, 1999.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0024-3205\(99\)00120-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00120-4)
- [3] K. Kelemen, C. Kiesecker, E. Zitron, A. Bauer, E. Scholz, R. Bloehs, D. Thomas, J. Greten, A. Remppis, W. Schoels, H. A. Katus, C. A. Karle, "Green tea flavonoid epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibits cardiac hERG potassium channels", *Biochem Biophys Res Commun*, Vol.364, No.3, pp. 429-35, Dec, 2007.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.10.001>
- [4] K. A. Kim, Y. Kim, "The effect of flavonoids on the TREK-1 channel", *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*, Vol.12, No.6, pp. 2660-2667, Jun, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.5762/KAIS.2011.12.6.2660>
- [5] E. J. Kim, D. Kang, J. Han, "Baicalein and wogonin are activators of rat TREK-2 two-pore domain K<sup>+</sup> channel", *Acta Physiol(Oxf)*, Vol.202, No.2, pp. 185-92, Jun, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-1716.2011.02263.x>
- [6] Y. Kim, C. Gnatenco, H. Bang, D. Kim, "Localization of TREK-2 K<sup>+</sup> channel domains that regulate channel kinetics and sensitivity to pressure, fatty acids and pH<sup>i</sup>", *Pflugers Arch*, Vol.442, No.6, pp. 952-60, Sep, 2001.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s004240100626>
- [7] G. Sandoz, D. Douguet, F. Chatelain, M. Lazdunski, F. Lesage, "Extracellular acidification exerts opposite actions on TREK1 and TREK2 potassium channels via a single conserved histidine residue", *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol.106, No.34, pp. 14628-33, Aug, 2009.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0906267106>
- [8] P. Lory, J. Chemin, "Towards the discovery of novel T-type calcium channel blockers", *Expert Opin Ther Targets*, Vol.11, No.5, pp. 717-22, May, 2007.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1517/14728222.11.5.717>
- [9] N. Villalonga, J. C. Ferreres, J. M. Argiles, E. Condom, A. Felipe, "Potassium channels are a new target field in anticancer drug design", *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, Vol.2, No.3, pp. 212-23, Nov, 2007.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/157489207782497181>
- [10] H. Moha ou Maati, R. Peyronnet, C. Devader, J. Veysié, F. Labbal, C. Gandin, J. Mazella, C. Heurteaux, M. Borsotto, "A human TREK-1/HEK cell line: a highly efficient screening tool for drug development in neurological diseases", *PLoS One*, Vol.6, No.10, pp. e25602, Oct, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0025602>
- [11] J. Kwak, Y. Kim, "The effect of antipsychotics and antidepressants on the TREK2 channel", *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*, Vol.13, No.5, pp. 2125-2132, May, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.5762/KAIS.2012.13.5.2125>
- [12] O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, F. J. Sigworth, "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches", *Pflugers Arch*, Vol.391, No.2, pp. 85-100, Aug, 1981.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00656997>
- [13] H. Bang, Y. Kim, D. Kim, "TREK-2, a new member of the mechanosensitive tandem-pore K<sup>+</sup> channel family". *J Biol Chem*, Vol.275, No.23, pp. 17412-9, Jun, 2000.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M000445200>
- [14] M. D. Brown, "Green tea (*Camellia sinensis*) extract and its possible role in the prevention of cancer", *Altern Med Rev*, Vol.4, No.5, pp. 360-70, Oct, 1999.
- [15] S. G. Brohawn, "How ion channels sense mechanical force: insights from mechanosensitive K2P channels TRAAK, TREK1, and TREK2", *Ann N Y Acad Sci*, Vol.1352, pp. 20-32, Sep, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/nyas.12874>
- [16] D. Maggioni, L. Biffi, G. Nicolini, W. Garavello, "Flavonoids in oral cancer prevention and therapy", *Eur J Cancer Prev*, Vol.24, No.6, pp. 517-28, Nov, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/CEJ.000000000000109>
- [17] L. C. Pyle, J. C. Fulton, P. A. Sloane, K. Backer, M. Mazur, J. Prasain, S. Barnes, J. P. Clancy, S. M. Rowe, "Activation of CFTR by the Flavonoid Quercetin: Potential Use as a Biomarker of ΔF508 CFTR Rescue", *Am J Respir Cell Mol Biol*, Vol.43, No.5, pp. 607-616, Nov, 2010.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1165/rcmb.2009-0281OC>
- [18] S. Saponara, G. Sgaragli, F. Fusi, "Quercetin as a novel activator of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in rat tail artery smooth muscle cells", *Br J Pharmacol*, Vol.135, No.7, pp. 1819-27, Apr, 2002.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0704631>
- [19] A. Cogolludo, G. Frazziano, A. M. Briones, L. Cobeno, L. Moreno, F. Lodi, M. Salas, J. Tamargo, F. Perez-Vizcaino, "The dietary flavonoid quercetin activates BK<sub>Ca</sub> currents in coronary arteries via production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Role in vasodilatation", *Cardiovasc Res*, Vol.73, No.2, pp. 424-31, Jan, 2007.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.09.008>
- [20] L. Yang, J. H. Ma, P. H. Zhang, A. R. Zou, D. N. Tu, "Quercetin activates human KV1.5 channels by a residue I502 in the S6 segment", *Clin Exp Pharmacol Physiol*, Vol.36, No.2, pp. 154-61, Feb, 2009.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1681.2008.05061.x>



- [21] Y. Kim, W. J. Kim, E. J. Cha, "Quercetin-induced Growth Inhibition in Human Bladder Cancer Cells Is Associated with an Increase in Ca-activated K Channels", *Korean J Physiol Pharmacol*, Vol.15, No.5, pp. 279-83, Oct, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.4196/kjpp.2011.15.5.279>
- [22] B. H. Lee, S. M. Jeong, J. H. Lee, J. H. Kim, I. S. Yoon, S. H. Choi, S. M. Lee, C. G. Chang, H. C. Kim, Y. Han, H. D. Paik, Y. Kim, S. Y. Nah, "Quercetin inhibits the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor-mediated ion current by interacting with pre-transmembrane domain I", *Mol Cells*, Vol.20, No.1, pp. 69-73, Aug, 2005.
- [23] B. H. Lee, S. H. Hwang, S. H. Choi, T. J. Shin, J. Kang, S. M. Lee, S. Y. Nah, "Quercetin Inhibits alpha3beta4 Nicotinic Acetylcholine Receptor-Mediated Ion Currents Expressed in *Xenopus* Oocytes", *Korean J Physiol Pharmacol*, Vol.15, No.1, pp. 17-22, Feb, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.4196/kjpp.2011.15.1.17>
- [24] H. Sun, X. P. Cheng, Z. You-Ye, P. Jiang, J. N. Zhou, "Quercetin subunit specifically reduces GlyR-mediated current in rat hippocampal neurons", *Neuroscience*, Vol.148, No.2, pp. 548-59, Aug, 2007.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.06.007>
- [25] B. H. Choi, J. S. Choi, D. S. Min, S. H. Yoon, D. J. Rhie, Y. H. Jo, M. S. Kim, S. J. Hahn, "Effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate, the main component of green tea, on the cloned rat brain Kv1.5 potassium channels", *Biochem Pharmacol*, Vol.62, No.5, pp. 527-35, Sep, 2001.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952\(01\)00678-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952(01)00678-5)
- [26] Z. Wang, "Roles of K<sup>+</sup> channels in regulating tumour cell proliferation and apoptosis", *Pflugers Arch*, Vol.448, No.3, pp. 274-86, Jun, 2004.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-004-1258-5>
- [27] K. Kunzelmann, "Ion channels and cancer", *J Membr Biol*, Vol.205, No.3, pp. 159-73, Jun, 2005.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00232-005-0781-4>
- [28] H. Ouadid-Ahidouch, A. Ahidouch, "K<sup>+</sup> channel expression in human breast cancer cells: involvement in cell cycle regulation and carcinogenesis", *J Membr Biol*, Vol.221, No.1, pp. 1-6, Jan, 2008.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00232-007-9080-6>
- [29] B. Rouzaire-Dubois, J. M. Dubois, "K<sup>+</sup> channel block-induced mammalian neuroblastoma cell swelling: a possible mechanism to influence proliferation", *J Physiol*, Vol.510(Pt 1), pp. 93-102, Jul, 1998.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.093bz.x>
- [30] A. Becchetti, "Ion channels and transporters in cancer. 1. Ion channels and cell proliferation in cancer", *Am J Physiol Cell Physiol*, Vol.301, No.2, pp. C255-65, Aug, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00047.2011>
- [31] B. Rouzaire-Dubois, V. Gerard, J. M. Dubois, "Involvement of K<sup>+</sup> channels in the quercetin-induced inhibition of neuroblastoma cell growth", *Pflugers Arch*, Vol.423, No.3-4, pp. 202-5, May, 1993.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00374395>
- [32] J. Y. Moon, Y. W. Song, H. B. Hyun, S. K. Cho, "Chemical Composition and Antiproliferative Activity of Supercritical Extract of Immature Citrus Peel in human

cervical carcinoma HeLa cells", *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*, Vol.16, No.12, pp. 8836-8843, Dec, 2015.

## 김 양 미(Yangmi Kim)

[정회원]



- 1993년 2월 : 경상대학교 수의학과 (수의학석사)
- 1997년 8월 : 경상대학교 수의학과 (수의학박사)
- 1997년 12월 ~ 2000년 6월 : Chicago Medical School 박사후 연수
- 2000년 9월 ~ 2003년 2월 : 서울대학교 의과대학 생리학교실 BK21 계약조교수
- 2003년 3월 ~ 현재 : 충북대학교 의과대학 의학과 부교수

<관심분야>

전기 생리학, 막수송 생리학

## 김 경 아(Kyung-Ah Kim)

[정회원]



- 1991년 2월 : 충북대학교 물리학과 (이학사)
- 1993년 2월 : 충북대학교 물리학과 (이학석사)
- 2001년 8월 : 충북대학교 의용생체공학과(공학박사)
- 2005년 3월 ~ 현재 : 충북대학교 의과대학 의학과 부교수

<관심분야>

생체계측, 호흡기류센서, 호흡생리학